

書誌

(19)【発行国】日本国特許庁 (JP)

(12)【公報種別】公表特許公報 (A)

(11)【公表番号】特表2000-509990 (P2000-509990A)

(43)【公表日】平成12年8月8日 (2000. 8. 8)

(54)【発明の名称】ヒトGタンパク質 β 3サブユニットに対する遺伝子における遺伝子変化の、疾患診断への使用

(51)【国際特許分類第7版】

C12N 15/09 ZNA C12Q 1/68

【F I】

C12N 15/00 ZNAA C12Q 1/68 A

【審査請求】未請求

【予備審査請求】有

【全頁数】19

(21)【出願番号】特願平9-540451

(86)(22)【出願日】平成9年5月2日 (1997. 5. 2)

(85)【翻訳文提出日】平成10年11月16日 (1998. 11. 16)

(86)【国際出願番号】PCT/EP97/02250

(87)【国際公開番号】WO97/43442

(87)【国際公開日】平成9年11月20日 (1997. 11. 20)

(31)【優先権主張番号】19619362. 1

(32)【優先日】平成8年5月14日 (1996. 5. 14)

(33)【優先権主張国】ドイツ (DE)

(81)【指定国】EP (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), EA (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), AU, BG, BR, CA, CN, CZ, GE, HU, IL, JP, KR, LV, MX, NO, NZ, PL, RO, RU, SG, SI, SK, TR, UA, US

(71)【出願人】

【氏名又は名称】ジッフェルト ヴィンフリーデ

【住所又は居所】ドイツ連邦共和国, エッセン D-45147, シェーンラインストラッセ 49

(72)【発明者】

【氏名】ジッフェルト ヴィンフリーデ

【住所又は居所】ドイツ連邦共和国, エッセン D-45147, シェーンラインストラッセ 49

(74)【代理人】

【弁理士】

【氏名又は名称】森田 憲一

(57)【要約】

本発明は、ヒトGタンパク質 β 3サブユニットに対する遺伝子における遺伝子変化の、疾患診断への使用に

関する。

【特許請求の範囲】

1. ヒトGタンパク質 β 3サブユニットに対する遺伝子における遺伝子変化の、疾患診断への使用。
2. ヒトGタンパク質 β 3サブユニットに対する遺伝子における遺伝子変化の、Gタンパク質調節異常に関連する障害発病のリスク確定への使用。
3. 遺伝子変化が、配列表のSEQ ID NO: 1に記載の配列中の275番のアミノ酸に対するコドンにおける遺伝子変異である、請求項2に記載の使用。
4. 配列表のSEQ ID NO: 1に記載の配列中の825番の位置においてシトシンがチミンによって置換されている、請求項3に記載の使用。
5. 障害が、心血管疾患、代謝障害、又は免疫疾患である、請求項2に記載の使用。
6. 障害が、高血圧症である、請求項2に記載の使用。
7. 対象者のヒトGタンパク質 β 3サブユニットの遺伝子配列と配列表のSEQ ID NO: 1の遺伝子配列とを比較し、そしてチミン(T)が825番の位置に存在する場合には、その対象者に疾患のリスクが増加していると判断することを含む、前記対象者にGタンパク質調節異常に関連する障害発病の相対的リスクを確定する方法。
8. シークエンシングによって遺伝子の比較を行う、請求項7に記載の方法。
9. シークエンシングの前に825番の位置を含む遺伝子領域を増幅する、請求項8に記載の方法。
10. ハイブリダイゼーションによって遺伝子の比較を行う、請求項7に記載の方法。
11. 制限酵素を用いる切断によって遺伝子の比較を行う、請求項7に記載の方法。
12. 制限酵素DsaIを用いる、請求項11に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

ヒトGタンパク質 β 3サブユニットに対する 遺伝子における遺伝子変化の、疾患診断への使用説明 本発明は、遺伝子分析、特にヒトグアニンヌクレオチド結合タンパク質(Gタンパク質)のサブユニットに対する遺伝子の分析による、疾患診断方法に関する。

ヘテロトリマー性グアニンヌクレオチド結合タンパク質(Gタンパク質)は、細胞内信号伝達においてかなりの重要性を有する。それらは、ホルモンレセプター及びレセプター活性化後に配座変化が発生する別のレセプターが刺激された後で、細胞外信号の中継を媒介する。このことによりGタンパク質の活性化が起こり、続いて活性化Gタンパク質は、細胞内エフェクター(例えば、イオンチャンネル、酵素)を活性化又は阻害することができる。ヘテロトリマー性Gタンパク質は、 α サブユニット、 β サブユニット、及び γ サブユニットの3個のサブユニットからなる。現在までに、異なる α サブユニット数種、 β サブユニット5種、及び γ サブユニット約12種が、生化学的方法及び分子生物学的方法によって検出されている(Birnbaumer, L. and Birnbaumer, M. Signal transduction by G proteins: 1994 edition. J. Recept. Res. 15:213-252, 1995; Offermanns, S. and Schultz, G. Complex information processing by the transmembrane signaling system involving G proteins. Naunyn Schmiedeberg's Arch.

Pharmacol., 42: 64-93, 1994; Birnbaumer, L., Gudermand, T., and Schultz, G. Receptors and G proteins as primary components of transmembrane signal transduction. Part 2. G proteins: structure and func

tion. J. Mol. Med. 73:123-132, 1995; Neer, E. J. Heterotrimeric G proteins: Organizers of Transmembrane Signals. Cell 80:249-257, 1995; Rens-Domiano, S. and Hamm, H. E. Structural and functional relationships of heterotrimeric G-proteins. FASEB J. 9:1059-1066, 1995).

レセプターが媒介する或る α サブユニットの活性化は、百日咳毒素 (PTX: pertussis toxin) での前処理によって阻害することができる。

これらには、特に α 異性体 ($\alpha i 1$ 、 $\alpha i 2$ 、及び $\alpha i 3$)、並びに種々の α -サブユニットが含まれる。また、これらのタイプのGタンパク質は、PTX感受性Gタンパク質とも称されている。

本発明者は、ヒトGタンパク質 $\beta 3$ サブユニットに対する遺伝子における遺伝

変化した。前記遺伝子変化は、Gタンパク質調節異常に関連する障害発病のリスクを確定するのに特に適している。

更に、本発明は、対象者のヒトGタンパク質 $\beta 3$ サブユニットの遺伝子配列と配列表のSEQ ID NO: 1の遺伝子配列とを比較し、そしてチミン (T)

が825番の位置に存在する場合には、その対象者に疾患のリスクが増加していると判断することを含む、前記対象者におけるGタンパク質調節異常 (ジスレギュレーション) に関連する障害発病の相対的リスクを確定する方法に関する。

本発明者が見出した前記の遺伝子変化は、ヒトGタンパク質 $\beta 3$ サブユニットに対する遺伝子中に位置する。この遺伝子は、Levineらによって既に記載されている [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87, (1990) 2329-2333]。そのコード領域は、275番の位置にセリンコドン「TCC」を有する。一方、Gタンパク質調節異常に関連する疾患のリスクが増加した対象者は、この位置に、コドン「TCT」 (これも同様にセリンをコードする) を有する。前記の遺伝子変化は、825番の位置においてシトシン (C)

がチミン (T) によって置換される塩基置換である。しかしながら、塩基のこの交換は、アミノ酸レベルでは「非顕在 (silent)」 (すなわち、この位置において異なるアミノ酸の挿入をもたらさない) である。疾患のリスクが増加している対象者において見出された前記の配列を、配列表中のSEQ ID NO: 1に記載する。

本発明者が見出した前記遺伝子変化は、通常、ヘテロ接合形態で発生する。

Gタンパク質調節異常に関連する障害は、Gタンパク質が信号伝達に関与していてその機能が生理学的方法で行われない疾患と規定される。

前記障害としては、心血管疾患、代謝障害、及び免疫疾患を挙げることができる。

心血管疾患としては：高血圧症、妊娠高血圧症 (妊娠中毒、妊娠中高血圧症)

、環状心臓病 (koronare Herzkrankheit)、局所性及び／又は広汎性アテローム血栓症、血管の狭窄症、血管再生処置後の再狭窄 (例えば、ステント移植を伴うPTCA及びステント移植を伴わないPTCA)、発作又は血栓症に対する傾向、及び血小板凝集の増加を挙げることができる。

代謝障害としては：代謝症候群、インスリン抵抗性及び高インスリン血症、二型真性糖尿病、糖尿病合併症 (例えば、腎症、神経障害、網膜症等)、脂質代謝障害、中枢化学受容障害 [CO₂ 耐性、アシドーシス耐性、乳児突然死 (SIDS)] を挙げることができる。

免疫疾患としては：体の免疫反応 [イムノグロブリンの形成、T細胞及びNK

能力を含む)に対する全般的低下傾向、腫瘍発生及び増殖(悪性転換細胞の転移能力を含む)の傾向、H I V感染後に病気が臨床的に明白となるまでの潜伏期間の持続、カポシ肉腫、肝臓の硬変傾向、移植耐性、及び移植拒絶を挙げることができる。

本発明による遺伝子突然変異の使用は、高血圧症発病のリスクを確定するのに特に適している。

更に、本発明は、前記の遺伝子突然変異を有する遺伝子導入動物の産生に関する。このタイプの遺伝子導入動物は、特に前記障害の研究及び治療用の動物モデルとして、非常に重要である。遺伝子導入動物の産生方法は、当業者に周知である。

疾患発病の相対的リスクを確定するための本発明の方法用に、対象者の遺伝情報を含む身体材料を対象者から採取する。これは、一般的には、血液を採取し、そこから核酸を単離することによって実施する。

Gタンパク質 β 3サブユニットに対する遺伝子の構造は、単離した対象者の核酸から確定し、そしてSEQ ID NO: 1に記載の配列と比較する。

前記遺伝子の構造は、前記核酸のシークエンシングによって確定することができる。これは、ゲノムDNAから直接、又は核酸の増幅(例えばPCR法による)の後に実施することができる。

前記遺伝子の構造は、ゲノムレベル、又はmRNA若しくはcDNAレベルで実施することができる。

cDNAをPCR増幅した後にシークエンシングにより確定することが好ましい。前記PCRに適したプライマーは、SEQ ID NO: 1に記載の配列から、当業者により容易に推察することができる。このための手順は、いずれの場合においても、関連塩基位置である825位の前又は後の鎖及び相補鎖に結合するプライマーを選択するのが有利である。

しかしながら、遺伝子の比較に、別の方法(例えば、選択的ハイブリダイゼーション又は制限酵素を用いる適当なマッピング)も用いることができる。前記の825番の位置におけるCからTへの塩基交換は、制限酵素DsaI(これは、遺伝的多型性の検出にも用いられる)の切断部位の欠損を発生させる。

或る人が825番の位置にチミン(T)を有するならば、その人は、その位置にシトシン(C)を有する人よりも疾病の大きなリスクを抱えていることになる。

以下の実施例において、本発明を更に説明する。

実施例1 シークエンシングによる、高血圧症における遺伝子変化の検出 本質的高血圧症患者に対する予備検査において、PTX感受性Gタンパク質の活性化に関する感受性の増強を検出した。この検出は、Na/H交換系の増強した活性を表現型マーカーとして有する患者由来の不活化細胞中で実施することができた。前記のPTX感受性Gタンパク質の活性化に関する感受性の増強は、細胞の機能に関してかなりの重要性を有する。それらとしては、細胞内セカンドメッセンジャー分子(例えば、イノシトール1, 4, 5-トリスホスフェート)の形成の増強、細胞内Ca²⁺イオン放出の増強、イムノグロブリン形成の増強、及び細胞成長速度の増強を挙げることができる。これらの変化が、不活化細胞中及

erung)が遺伝学的に固定されていると考えることができる(Rossko

tensive sodium-proton exchanger phenotype persists in immortalized lymphoblasts from essential hypertensive patients—a cell culture model for human hypertension. J. Clin. Invest. 92:2553–2559, 1993; Roskopf, D., Hartung, K., Hense, J., and Siffert, W. Enhanced immunoglobulin formation of immortalized B cells from hypertensive patients.

Hypertension 26:432-435, 1995; Roszkopf,

f sodium-hydrogen exchange in the proliferation of immortalised lymphoblasts from patients with essential hypertension and normotensive subjects. Cardiovasc. Res. 29:254-259, 1995; Siffert, W., Roszkopf, D., Moritz, A., Wieland, T., Kaldenberg-Stasch, S., Kettler, N., Hartung, K., Beckmann, S., and Jakobs, K.

H. Enhanced G protein activation in immortalized lymphoblasts from patients with essential hypertension. J. Clin. Invest. 96:759-766, 1995).

RNAを、高血圧症対象者由来の不死化細胞系から、標準的方法によって調製し、逆転写酵素を用いてcDNAに転写した。ポリメラーゼ鎖反応(PCR)を用いてGタンパク質G3サブユニットをコードするcDNAを増幅し、そしてシーケンシングを行った。以下のオリゴヌクレオチドプライマー:5'-TGG GGG AGA TGG AGC AAC TG及び5'-CTG CTG AGT GTG TTC ACT GCCを前記PCRに用いた。

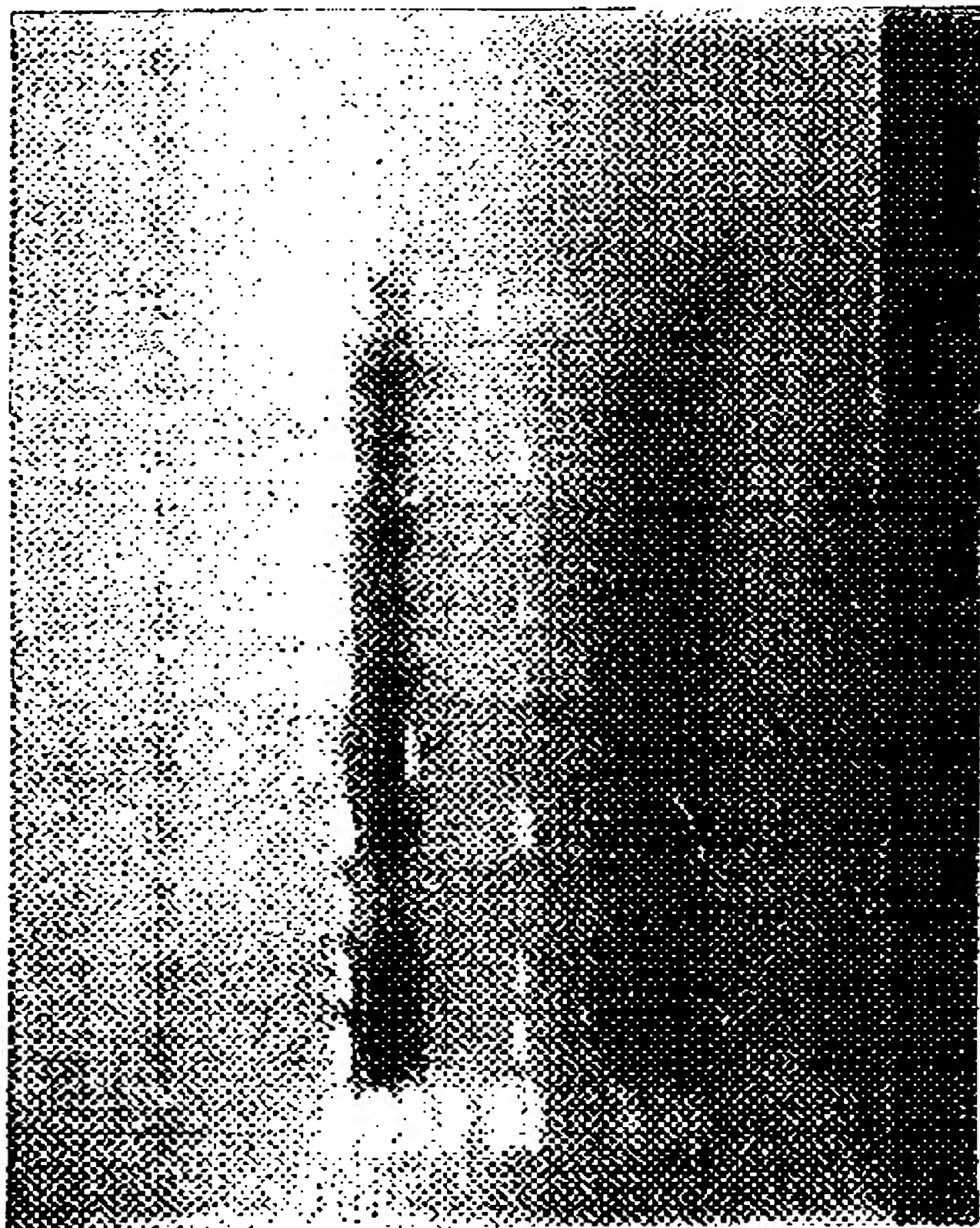
Levineらにより発行された配列(Levine, M. A., Smallwood, P. M., Moen, P. T., Jr., Helman, L. J., and Ahn, T. G. Molecular cloning of β 3 subunit, a third form of the G protein β -subunit polypeptide. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87(6):2329-2333, 1990)と比較し、高血圧症対象者細胞からのcDNA中で以下の差異を発見した:配列コード領域中のヌクレオチド825シトシン(C)が、チミン(T)(ヌクレオチド1は、開始コドン「ATG」中の塩基Aに相当する)により置換されている。

この塩基交換により、非顕在多型性を導く。すなわち、相当する塩基トリプレットによってコードされるアミノ酸(セリン)は、本来の配列と比較して変更されない。発見された遺伝子配列は、SEQ ID NO: 1に記載されている。

実施例2制限酵素分析による、高血圧症対象者における遺伝子変化の検出 図は、制限酵素分析による、正常血圧対象者由来の遺伝子と高血圧症対象者由来の遺伝子との比較を示す。この中で、正常血圧対象者(NT)及び高血圧症対象者(HT)からの細胞由来のG3をコードするcDNA(PCR法で予め増幅したもの)を、酵素DsaIを用いて制限酵素分析した。その反応生成物を、アガロースゲル中に分画し、それを図に示す。

DsaIによる消化後の、正常血圧細胞由来のG3cDNAの完全な制限が、図によって明瞭に示されている。高血圧症対象者細胞由来のcDNAは、DsaIによって、部分的にしか切断されていない。予想される切断生成物とは別に、切断していないPCR生成物も存在する。サイズ比較のための対照フラグメント(マーカー)が、左端及び右端に配置されている。図に記載の高血圧症対象者からのDNA配列5個のうち4個は、前記の塩基交換を示しており、この変化に関してヘテロ接合である。

NT NT NT NT HT HT HT HT HT HT



BEST AVAILABLE COPY